

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Pferde

Für die Versuche standen sechs institutseigene Vollblutpferde zur Verfügung. Die Pferde wurden täglich (außer sonntags) mit den anderen in Newmarket befindlichen Vollblutrennpferden trainiert. Dreimal täglich (morgens, mittags, abends) erhielten die Pferde eine individuell angepasste Kraffutter- und Heuration. Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Die Pferde waren in 3 x 3 m großen Boxen aufgestellt. Als Einstreu dienten Papierschnitzel. Für die Dauer des jeweiligen Tierexperiments wurden die Pferde in die unter 3.2. *Stoffwechselbox* beschriebenen Stände verbracht. Sie wurden in diesem Zeitraum morgens und abends für jeweils 30-60 min. im Schritt geführt und nahmen nicht am üblichen Training teil. Für den Rest des Tages waren sie in diesen speziellen Ständen untergebracht. Aufgrund der geringen körperlichen Belastung erhielten sie während dieser Zeit eine geringere Kraffuttermenge und eine größere Heuration sowie Wasser ad libitum. Für die Experimente wurden keine Hengste als Versuchstiere verwendet, um bei der Bestimmung der Metaboliten, der zu untersuchenden Wirkstoffe Störungen durch die hohe endogene Androgenproduktion und -verstoffwechslung zu vermeiden.

Folgende Vollblutrennpferde wurden für die einzelnen Versuche eingesetzt (Tab. 6):

**Tab. 6:** Übersicht, über die in den Versuchen eingesetzten Vollblutrennpferde

Pferd Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	Stute	4
2	Wallach	7
3	Wallach	5
4	Wallach	4
5	Wallach	16
6	Stute	5

Das Gewicht der jeweils eingesetzten Pferde zu Versuchsbeginn findet sich bei den einzelnen Versuchen (s. 4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse).

#### 3.2. Stoffwechselbox

Für die Dauer der einzelnen Versuche wurden die Pferde in Stoffwechselboxen verbracht. Der Boden der Box wurde während des Versuchs nicht mit Einstreu versehen. Neben einer

Seitenwand der Box befand sich unter Bodenniveau ein mit Holzplanken abgedeckter Raum zur Aufnahme der unterschiedlichen Urinsammelbehälter (s. 3.3.2. Nach der Applikation).

### 3.3. Versuchsablauf

Einige Tage und unmittelbar vor der Applikation des zu untersuchenden Wirkstoffes wurden Plasma- und Urinproben von den ausgewählten Versuchspferden als Kontrollwerte gewonnen.

*Plasmaproben:* Aus der *Vena jugularis* wurden etwa 25 ml Vollblut in einer Monovette aufgefangen. Die Blutproben wurden sofort bei 3000 U/min. für 10 min. zentrifugiert (Zentrifuge: Centaur 2, Fisons Instruments, Sussex U.K.). Nach der Zentrifugation wurde das Plasma mittels einer Pasteurpipette in 20 ml Plastikschraubgefäße überführt und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

*Urinproben:* An zwei unterschiedlichen Tagen wurde von jedem Pferd jeweils vor- und nachmittags eine Urinprobe gewonnen. Der frei abgesetzte Urin wurde in einem Sammelbehälter aufgefangen. Von dem gesammelten Urin wurden 250 ml in eine Plastikflasche umgefüllt und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Der restliche Urin wurde verworfen.

#### 3.3.1. Reinheitsbestimmung der verwendeten Steroide

Die Reinheit der zu verabreichenden Steroide wurde mittels dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Substanzen nach der unter 3.5.5.3. *Proben von Dünnschichtchromatographie-Platten* beschriebenen Methode überprüft.

Die Reinheit der radioaktiv markierten Steroid-Lösungen wurde ebenfalls nach der dünnschichtchromatographischen Trennung mittels Flüssigkeitsszintillationszählung auf das Vorhandensein radioaktiv markierter Verunreinigungen überprüft (s. 3.5.5.3. *Proben von Dünnschichtchromatographie-Platten*).

#### 3.3.2. Applikation

##### 3.3.2.1. Intramuskuläre Applikation von Dehydroepiandrosteron (DHA)

Als einziger untersuchter Wirkstoff wurde DHA auch parenteral durch intramuskuläre Injektion verabreicht. Hierzu wurde ein Gemisch aus DHA, D<sub>2</sub>-DHA und <sup>3</sup>H-DHA in öliger Lösung hergestellt. Vor der Injektion wurde den beiden Versuchspferden für die spätere Blutentnahme ein Verweilkatheter in die *V.jugularis* gelegt. Daraufhin wurde die gesamte Dosis intramuskulär in die Glutäalmuskulatur injiziert (s. 4.1. Dehydroepiandrosteron - VERSUCH A).

### Zubereitung der Dosis

An jedes Versuchspferd sollte eine DHA-Dosis von 200 mg (bestehend aus jeweils 100 mg DHA und D<sub>2</sub>-DHA) sowie eine radioaktive Dosis von etwa 250 µCi <sup>3</sup>H-DHA verabreicht werden. Das zu verabreichende Substanzgemisch wurde folgendermaßen zubereitet:

Von einer 250 µCi entsprechenden Menge von <sup>3</sup>H-DHA gelöst in Ethanol wurde unter Stickstoff das Lösungsmittel abgedampft und die verbleibende Festsubstanz anschließend wieder in 5 ml Methanol gelöst. 5 Stichproben zu 2 µl wurden zur Feststellung der enthaltenen Radioaktivität entnommen und das restliche Methanol unter Stickstoff abgedampft. Die verbliebene Fest-Substanz wurde nach Zugabe eines Gemisches aus jeweils 100 mg DHA und D<sub>2</sub>-DHA in 0,5 ml Ethanol gelöst und dieser Lösung 8-10 ml Erdnußöl, das im Strahlensterilisator keimfrei gemacht worden war, hinzugefügt. Die ölige Lösung wurde den beiden Versuchspferden intramuskulär (in die Glutäalmuskulatur) verabreicht. Alle verwendeten Utensilien, die mit dem radioaktiv markierten DHA in Berührung gekommen waren, wurden gründlich mit Ethanol gespült. Diese Spüllösung wurde gesammelt und nach Volumenbestimmung Stichproben (von 200 µl und 400 µl) zur Feststellung der verbliebenen Radioaktivität entnommen. Dadurch konnte die nicht verabreichte, radioaktive Dosis ermittelt und somit die tatsächlich verabreichte, radioaktive Dosis berechnet werden.

### 3.3.2.2. Orale Applikation

#### 3.3.2.2.1. Per Nasenschlundsonde

Bei zwei Versuchen wurden den Pferden per Nasenschlundsonde jeweils folgende Zubereitungen verabreicht:

1. DHA, D<sub>2</sub>-DHA & <sup>14</sup>C-DHA
2. MAD, D<sub>3</sub>-MAD & <sup>3</sup>H-MAD
3. 17α-MT & D<sub>3</sub>-17α-MT

Angaben über die quantitative Zusammensetzung finden sich unter 4.1. *Dehydroepiandrosteron* und 4.2. *Methandriol*.

### Zubereitung der Dosis

An jedes Versuchspferd sollte eine Steroid-Dosis von 200 mg sowie eine zusätzliche radioaktive Dosis verabreicht werden. Reinsubstanz und deuterierte Substanz sollten im Verhältnis 1:1 und zu jeweils 100 mg verabreicht werden. Zunächst wurde ein

Substanzgemisch aus 100 mg Reinsubstanz und 100 mg deuteriertem Steroid zubereitet. Die zuzufügende radioaktiv-markierte Lösung wurde wie folgt hergestellt:

Die im Originalbehälter befindliche, radioaktive Steroid-Lösung wurde zu gleichen Teilen in zwei Glasgefäße überführt. Der Originalbehälter wurde anschließend mehrere Male mit Ethanol gespült und auch diese Spüllösungen gleichmäßig auf die zwei Gefäße verteilt. Anschließend wurden beide Spüllösungen mit Ethanol auf jeweils 5 ml aufgefüllt. Im Originalbehälter verbliebenes Ethanol wurde mittels Scintillationszählung auf seinen Gehalt an radioaktiv markiertem Steroid überprüft.

Die 2 x 5 ml ethanolische Steroid-Lösung wurde in je einen 250 ml Erlenmeyerkolben quantitativ durch Nachspülen mit Ethanol überführt. Diesen Lösungen wurden die jeweils vorher hergestellten Substanzgemische zugefügt und mit 50 ml entionisiertem H<sub>2</sub>O auf 65 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Durchmischen der beiden Lösungen wurden zur Bestimmung der radioaktiven Gesamtdosis von jeder der Lösungen 5 x 25 µl Stichproben zur Flüssigscintillationszählung entnommen.

Den so hergestellten, leicht milchigen Lösungen wurden, zur vollständigen Auflösung der zugegebenen Festsubstanzen, nochmals je 50 ml Ethanol zugefügt. Die nun klaren Lösungen wurden durch Nasenschlundsonden an die beiden Versuchspferde verabreicht. Die Erlenmeyerkolben wurden anschließend mit reichlich Wasser gespült und auch diese Spüllösungen noch durch die Sonden an die Versuchspferde verabreicht.

Alle mit dem radioaktiv-markiertem Material in Berührung gekommenen Utensilien (Laborgeräte, Nasenschlundsonden, Trichter) wurden gründlich (mit Methanol) gespült sowie anschließend Stichproben dieser Spüllösungen zur Scintillationszählung entnommen. Somit konnte der Anteil nicht-verabreichten, radioaktiv-markierten Steroids pro Pferd bestimmt und die an jedes Pferd tatsächlich verabreichte radioaktive Dosis berechnet werden.

#### **3.3.2.2.2. Über das Futter**

Bei drei Versuchen wurden den Pferden folgende Zubereitungen verabreicht:

1. MAD (als Reinsubstanz ohne weitere Isotope)
2. 17 $\alpha$ -MT als Reinsubstanz (in Orandrone<sup>®</sup> Tablets, Intervet U.K. Ltd.)

#### **Zubereitung der Dosis**

Diese Substanzen wurden als Pulver vermischt mit der üblichen Morgenration (Quetschhafer, Melasse, Pellets) den Pferden angeboten. Die Versuchspferde wurden während der gesamten Kraffutteraufnahme beobachtet. Dadurch konnte sichergestellt werden, daß die Futterration

vollständig und damit die gesamte Pharmakonmenge aufgenommen wurde. Innerhalb von 10 – 15 Minuten hatten alle Pferde die angebotene Futterration vollständig aufgenommen. Den Pferden wurde anschließend ein Verweilkatheter in die *V.jugularis* gelegt. Angaben zu den jeweiligen Versuchspräparaten finden sich unter 4.2. *Methandriol* und 4.3. *17 $\alpha$ -Methyltestosteron*.

### 3.3.2. Nach der Applikation

*Plasmaproben:* Während der ersten zwölf Stunden nach Verabreichung der jeweiligen Substanzen wurden zu den folgenden Zeitenpunkten über den Verweilkatheter Blutproben von jeweils 25 ml entnommen: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 und 12,0 Stunden nach der Applikation. Die Pferde verblieben während der Blutentnahme in ihren Ständen. Zwölf Stunden nach der Applikation wurde der Verweilkatheter, nach Entnahme der letzten Blutprobe, entfernt. Die weiteren Blutentnahmen, 24 und 48 Stunden nach Verabreichung der Dosis, wurden durch Punktion der *V.jugularis* vorgenommen. Wenn radioaktive Substanzen verabreicht worden waren, wurden vor dem Einfrieren Aliquote der einzelnen Plasmaproben zur Feststellung der darin enthaltenen Radioaktivität entnommen. In diesen Versuchen waren Aliquote der vor der Applikation der Radioaktivität gewonnenen Plasmaproben (s. 3.3. Versuchsablauf) als Kontrollwerte entnommen worden.

*Urinproben:* Unmittelbar nach der Applikation wurde ein Geschirr zum Auffangen des frei abgesetzten Urins angelegt und die Pferde in die Stoffwechselbox verbracht. Mit Hilfe des Spezialgeschirrs wurde ein Trichter so unter dem Bauch des Pferdes im Bereich der Hinterextremitäten fixiert, daß der abgesetzte Urin aufgefangen werden konnte. Diese Vorrichtung ließ sich nach entsprechender Justierung sowohl für Wallache als auch für Stuten verwenden. Über einen Schlauch wurde der angefallene Urin in Plastikkanistern gesammelt, die regelmäßig kontrolliert wurden. Sobald sich Urin in einem Kanister befand, wurde dieser gegen ein leeres Exemplar ausgetauscht. Der ungefähre Füllungszeitpunkt des Kanisters wurde notiert. Über Nacht wurde der Urin mittels eines 'Auffangkarussells' mit zwölf Gefäßen gesammelt. In jedes Plastikgefäß wurde 80-90 min. lang Urin aufgefangen. Die gesammelten Urinmengen wurden nach Bestimmung des Volumens umgefüllt und bei -20°C gelagert. Wenn radioaktive Substanzen verabreicht worden waren, wurden vor dem Einfrieren Aliquote aus den einzelnen Urinproben zur Feststellung der darin enthaltenen Radioaktivität entnommen (s. 3.5.5.1. Plasma- und Urinproben und 4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse). Bei diesen Versuchen waren Aliquote der vor der Applikation der Radioaktivität gewonnenen Urinproben (s. 3.3. Versuchsablauf) als Kontrollwerte entnommen worden.

In den NACHWEIS-Versuchen wurde von jedem Pferd eine Urinprobe als Nullwert gewonnen. Nach der Applikation wurden über zwei Tage viermal täglich Urinproben mittels Eimer aufgefangen. Am dritten Tag wurde vormittags eine weitere Urinprobe gewonnen.

Alle im Rahmen dieser Studie durchgeführten Tierversuche waren von der Ethikkommission des Horseracing Betting Levy Boards geprüft und genehmigt worden. Während der Vorbereitungen sowie der Durchführung der einzelnen Tierversuche war ein Tierarzt des Horseracing Betting Levy Boards anwesend.

### **3.4. Steroide, Chemikalien und Sonstige verwendete Substanzen**

Die folgenden Tabellen geben Auskunft über die in den verschiedenen Versuchen verwendeten Steroide (Tab. 7), Chemikalien (Tab. 8) und Sonstigen verwendeten Substanzen (Tab. 9).

**Tab. 7:** Übersicht, über die in den Versuchen verwendeten Steroide

Steroide	Hersteller bzw. Bezugsquelle
DHA (Reinsubstanz)	Sigma Chemical Co, St. Louis, U.S.A.
<sup>3</sup> H-DHA	NEN Research Prod., Stevenage, Herts., U.K.
<sup>14</sup> C-DHA	NEN Research Prod., Stevenage, Herts., U.K.
D <sub>2</sub> -DHA	HFL-intern synthetisiert*, STD: 1mg/ml Methanol
MAD (Reinsubstanz)	HFL-intern synthetisiert, STD: 1mg/ml Methanol
<sup>3</sup> H-MAD	HFL-intern synthetisiert, STD: 1mg/ml Methanol
D <sub>3</sub> -MAD	HFL-intern synthetisiert, STD: 1mg/ml Methanol
17α-MT (Reinsubstanz)	HFL-intern synthetisiert, STD: 1mg/ml Methanol
D <sub>3</sub> -17α-MT	HFL-intern synthetisiert, STD: 1mg/ml Methanol
17α-MT (Orandrone®)	Intervet U.K. Ltd., Cambridge, U.K.
Androstendiol-Isomere	Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A., STD: 1mg/ml Methanol
Androsteron	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A., STD: 1mg/ml Methanol
D <sub>3</sub> -Androstandiol	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A., STD: 1mg/10ml Methanol
Testosteron	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A., STD: 1mg/ml Methanol

\* Die im Labor synthetisierten Steroide wurden von Dr. Angus Nedderman, PhD, aus DHA und <sup>3</sup>H-DHA durch Grignard Reaktionen mit anschließender Oppenauer Oxidation hergestellt (DJERASSI, 1951, 1963; WAGNER u. ZOOK, 1953; SCHOENE et al., 1994).



**Tab. 8:** Übersicht, über die in den Versuchen verwendeten Chemikalien

Chemikalien zur Extraktion	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Azetonitril	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
1,2-Dichlorethan	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Diethylether	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Ethanol	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Ethylacetat	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Hexan	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Methanol	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Molybdophosphorsäure	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Natriumsulfat (wasserfrei)	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
konzentrierte Schwefelsäure	Romil Chemicals, Loughborough, Leics., U.K.
Salzsäurelösungen*	BDH Chemical Company, Dorset, U.K.
unterschiedlicher Molarität (0,1 mol/l; 1 mol/l; 4 mol/l)	
gesättigte Natriumcarbonatlösung*	BDH Chemical Company, Dorset, U.K.
gesättigte Natriumchloridlösung*	BDH Chemical Company, Dorset, U.K.
Natriumhydroxidlösungen*	BDH Chemical Company, Dorset, U.K.
unterschiedlicher Molarität (0,1 mol/l; 1 mol/l; 4 mol/l)	
Natriumacetat(-Trihydrat)-Puffer*	BDH Chemical Company, Dorset, U.K.
(0,1 mol/l, pH-Wert: 3,0)	
Phosphatpuffer (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )*	BDH Chemical Company, Dorset, U.K.
(0,1 mol/l, pH-Wert 6,8)	

\*Diese Lösungen wurden unter Verwendung von entionisiertem Wasser und der chemischen Reinsubstanzen - bezogen bei BDH Chemical Company, Dorset, U.K. - laborintern hergestellt. Alle Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad.

**Tab 8:** Fortsetzung

Chemikalien zur Derivatisierung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Sephadex LH-20*	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
MSTFA (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NOSi)	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
MTBSTFA (C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NOSi)	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
MSTFI (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Si)	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Diethylamin Hydrochlorid	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Hydroxylamin Hydrochlorid	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Methoxylamin Hydrochlorid	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Pyridin (getrocknet)	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Dimethylformamid	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Ammoniumiodid (NH <sub>4</sub> I)	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Dithioerythritol	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.
Undekan	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.

\*Vor der Anwendung: Waschen mit entionisiertem Wasser und Methanol, anschließend Trocknen.  
Alle verwendeten Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad.

**Tab. 9:** Übersicht, über die in den Versuchen verwendeten Sonstigen Substanzen

Sonstige verwendete Substanzen	Hersteller bzw. Bezugsquelle
DC Kieselgel 60H (mittlere Korngröße)	Merck, Darmstadt, DEUTSCHLAND
F <sub>254</sub> -Platten (DC Alufolien) (20 x 20 cm; 0,2 mm Schichtdicke) vorbeschichtet mit Kieselgel 60 für Dünnschichtchromatographie	Merck, Darmstadt, DEUTSCHLAND
.Millipore Ultrafree-MC, non-sterile, 10000NMWL Filter Unit 10µm Porengröße, Polysulfone Type PTGC Ultrafiltration volume: 400µl	Millipore Ltd., Watford, Herts., U.K
Palladium-Barium-Sulfat (5% Pd auf BaSO <sub>4</sub> als Matrix) Katalysator	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A
Insta-Gel <sup>®</sup> Scintillationsflüssigkeit	Canbra Packard, Panybourne Berks. U.K.
<i>E. coli</i> -Festsubstanz enthaltend β-Glucuronidase Daraus wurde unter Zufügung von 0,1 mol/l Phosphatpuffer mit pH-Wert 6,8 (s. 3.4.2.1. Chemikalien zur Extraktion) eine Lösung in der Konzentration von 1000 IE β-Glucuronidase/100µl hergestellt.	Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A
Polysten B / XAD-2 Amberlite Körner	HFL-eigene Bestände
Gereiniger Sand	BDH Chemicals Ltd., Poole, Dorset, U.K.
Waters SepPak-Cartridges Füllmaterial: Kieselgel	Millipore, Watford, Herts, U.K.
BondElut-Cartridges Füllmaterial: Kieselgel	Jones Chromatography, Hengold, U.K.
Isolate <sup>™</sup> SpeColumns-Cartridges (300mg, 6ml)	Intern. Sorbent Tech., Hengold, U.K.
Whatman Filter Paper	Whatman, England, U.K.
Verweilkatheter Intraflon 2 Trocart Catheter I.V. Teflon, L:80mm i.D.: 1mm; G:14	Vygon UK Ltd., Gloucestershire, U.K.
Lockable Obturators with Cap (SB/ Latex)	Vygon UK Ltd., Gloucestershire, U.K.
25ml Li/Heparin LH/25 Sarstedt Monovetten <sup>®</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, DEUTSCHLAND

### 3.5. Steroidanalytik

#### 3.5.1. Extraktionsmethoden

Die im folgenden beschriebenen Methoden wurden teilweise mit unbedeutenden, im einzelnen jeweils angegebenen Abweichungen durchgeführt (HOUGHTON et al., 1978; VAN HORNE, 1985; DUMASIA und HOUGHTON, 1986; HOUGHTON et al., 1986).

Bei der Verarbeitung von radioaktiv markiertem Urin wurden alle anfallenden Volumina des Urins, der Extrakte und der Waschlösungen bestimmt. Gleichzeitig wurden von jeder Lösung Aliquote zur Feststellung der Radioaktivität entnommen. Der bei der überwiegenden Anzahl der Extraktionen verwendete 24-Stunden Urin ( $U_{24}$ ) wurde folgendermaßen hergestellt (HOUGHTON et al., o.J.):

#### $U_{24}$ :

Jeweils 10 Volumenprozent jedes, während der ersten 24 Stunden nach der Applikation einzeln gesammelten Urinvolumens wurden entnommen und zu einem 24 Stunden Urin-Pool ( $U_{24}$ ) zusammengefaßt.

### 3.5.1.1. METHODE A

#### KOMBINIERTE FLÜSSIG- UND FESTPHASEN-EXTRAKTION (Abb. 7)

- im HFL entwickelte Methode (HOUGHTON et al., o.J.) -

##### I. Extraktion der Metaboliten

###### a. Extraktion der unkonjugierten Metaboliten (Freie Fraktion = FFR)

15 ml an  $U_{24}$  wurde bei 3500 U/min. für 10 min. zentrifugiert.

10 ml des zentrifugierten Urins wurden als  $U_{VE}$  mit 20 ml Diethylether in einem Abscheidetrichter für 30 min., unter ständigem Rollen, durchmischt. Nach dem Durchmischen wurde der Abscheidetrichter für etwa 5-10 min. stehengelassen, um eine möglichst weitgehende Trennung der beiden Phasen zu ermöglichen. Die untere Phase, der  $U_{NE}$ , wurde durch Öffnen des Auslaufhahnes vorsichtig von der Ether-Phase getrennt. Der  $E_{NE}$ , welcher jetzt die freien Metaboliten enthielt, wurde bis zur Weiterverarbeitung bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

###### b. Getrennte Extraktion der Glucuronid- (GFR) und Sulfat-(SFR) Konjugate

Der pH-Wert des  $U_{NE}$  wurde mit Hilfe von Natronlauge- und Salzsäurelösungen der Molaritäten 0,1 mol/l, 1 mol/l, 4 mol/l und konzentrierte Lösungen auf pH 6,8 eingestellt. Zur Freisetzung der glucuronidierten Steroide aus ihrer Esterbindung wurden pro 5 ml Urin 1000 Einheiten  $\beta$ -Glucuronidase hinzugefügt. Diese Lösung wurde in einem Wasserbad entweder bei 50°C für zwei Stunden oder bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Ausbeute an bei der Hydrolyse freiwerdenden Metaboliten war bei beiden Methoden etwa gleich groß.

Falls erforderlich wurde dem  $U_{NH}$  vor der Kartuschen-Extraktion als interner Standard 1  $\mu$ g  $D_3$ -Androstandiol (10  $\mu$ l einer Stammlösung von 1 mg gelöst in 10 ml Methanol) zugesetzt. Der  $U_{NH}$  wurde, nachdem er auf Zimmertemperatur abgekühlt war, über einer SepPak  $C_{18}$ -Kartusche extrahiert. Zunächst wurde die Kartusche mit je 5 ml Methanol und entionisiertem Wassers aktiviert. Danach wurde die gesamte Urinmenge aufgetragen und die Kartusche anschließend zuerst mit 5 ml entionisiertem Wassers und dann mit 5 ml Hexan gewaschen. Die Extraktion der freien, nicht konjugierten Metaboliten erfolgte mit 5 ml Diethylether. Anschließend erfolgte die Extraktion der noch als Konjugate vorliegenden SFR-Metaboliten mit 5 ml "Solvolyselösung" (bestehend aus: 100 ml Ethylacetat, 20 ml Methanol, 4 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure). Das Eluat wurde in einem Wasserbad entweder bei 50°C für zwei Stunden oder bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Ausbeute der bei der Säurehydrolyse

freiwerdenden Metaboliten war bei beiden Methoden etwa gleich groß.

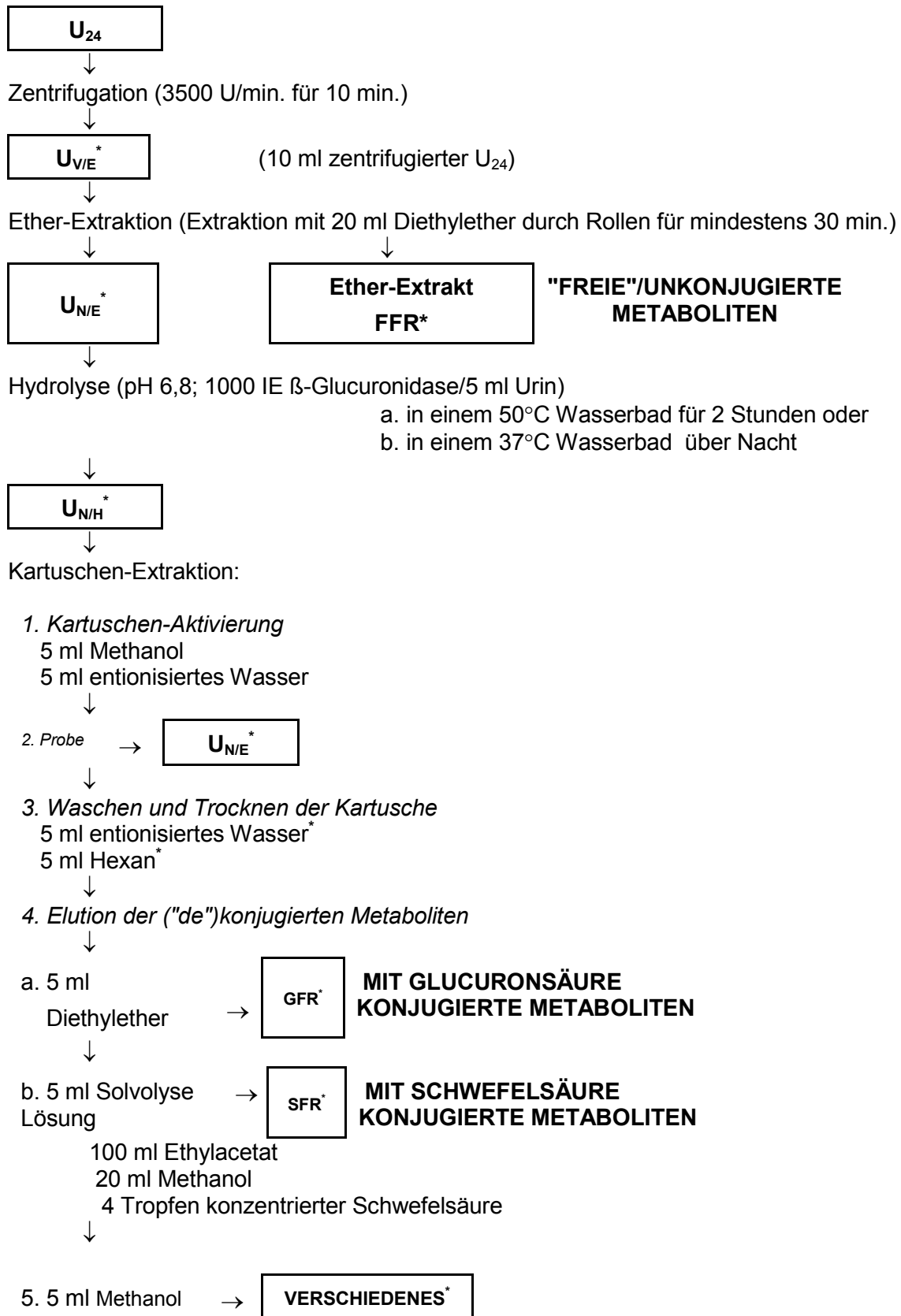
Dieser Lösung wurde, falls erforderlich, vor der Spaltung der Sulfate noch 1 µg des internen Standards D<sub>3</sub>-Androstandiol zugesetzt. Anschließend wurden eventuell noch auf der Kartusche verbliebene Steroidmetaboliten mit 5 ml Methanol eluiert.

## II. Waschen und Trocknen der Extrakte

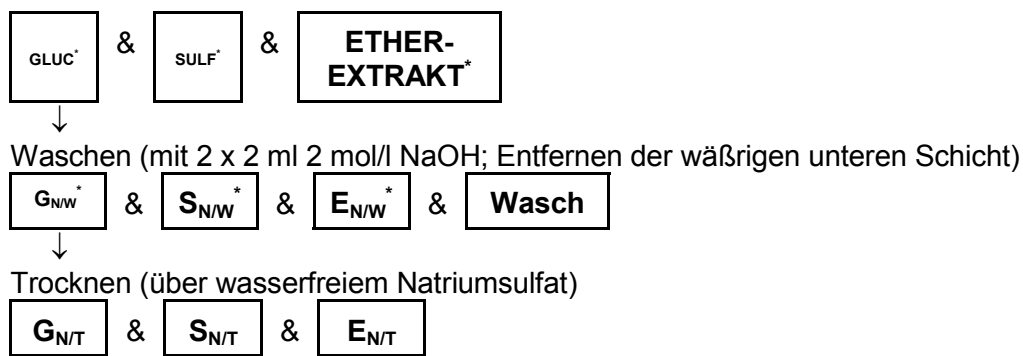
Die nach Hydrolyse der Glucuronid- und Sulfatkonjugate erhaltenen Eluate sowie der Ether-Extrakt der Flüssigextraktion wurden zunächst mit 2 x 2 ml bzw. 2 x 4 ml (für den Ether-Extrakt) 2 mol/l Natronlauge gewaschen. Dabei wurde jedesmal mit Hilfe eine Pasteurpipette die untere (gefärbte) Schicht der Lösungen entnommen. Dadurch konnten chromogene Substanzen und phenolische Verbindungen aus den Extrakten entfernt werden. Die drei Lösungen G<sub>NW</sub>, S<sub>NW</sub> und E<sub>NW</sub> wurden anschließend für mindestens 10 min. über einem bzw. zwei (für den Ether-Extrakt) Spatel wasserfreien Natriumsulfat getrocknet. Die G<sub>N/T</sub>- und S<sub>N/T</sub>-Lösungen wurden dann vermittels einer Pasteurpipette in 3 ml Glasschraubgefäße überführt und unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Die verbleibenden Rückstände wurden anschließend derivatisiert (s. 3.5.4. Derivatisierungen). Die E<sub>N/T</sub>-Lösung wurde in einen Rundkolben überführt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 2 ml Methanol gelöst, in ein 3 ml Glasschraubgefäß überführt, Methanol unter Stickstoff völlig abgedampft und die verbleibende Festsubstanz derivatisiert (s. 3.5.4. Derivatisierungen).

## URINANALYSE

### I. Extraktion der Metaboliten



## II. Waschen und Trocknen der Extrakte



Legende:

*	Entnahme von Stichproben für die Scintillationszählung
E <sub>N/T</sub> :	Ether nach dem Trocknen
E <sub>NW</sub> :	Ether nach dem Waschen
FFR:	Freie / unkonjugierte Metaboliten
GFR:	mit Glucuronsäure veresterte Metaboliten
G <sub>N/T</sub> :	GFR nach dem Trocknen
G <sub>NW</sub> :	GFR nach dem Waschen
SFR:	mit Schwefelsäure veresterte Metaboliten
S <sub>N/T</sub> :	SFR nach dem Trocknen
S <sub>NW</sub> :	SFR nach dem Waschen
U <sub>24</sub> :	24h Urin-Pool
U <sub>N/E</sub> :	Urin nach der (Ether/Kartuschen) Extraktion
U <sub>N/H</sub> :	Urin nach der Hydrolyse
U <sub>V/E</sub> :	Urin vor der (Ether/Kartuschen) Extraktion
Wasch:	verschiedene Waschlösungen

**Abb. 8:** Standardurinextraktionsmethode - Das obige Flußdiagramm zeigt die bei der Mehrzahl der Experimente durchgeführte Standardextraktionsmethode, die mit dem Derivatisierungsverfahren DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1.) kombiniert wurde (HOUGHTON et al., o.J.).



### 3.5.1.2. METHODE B

#### KOMBINIERTE FEST-/FEST-/FLÜSSIGPHASEN-EXTRAKTION

- im HFL entwickelte Methode (DUMASIA, 1981) -

#### I. Trennung von GFR und SFR

##### a. Extraktion der gesamten Steroidmetaboliten

15 ml an  $U_{24}$  wurde bei 3500 U/min. zentrifugiert.

10 ml des zentrifugierten Urins wurden über einer SepPak  $C_{18}$ -Kartusche, die mit je 10 ml Methanol und entionisiertem Wasser aktiviert worden war, extrahiert. Nach Waschung der beladenen Kartusche mit 10 ml entionisierten Wassers wurden die freien und konjugierten Steroide dann mit 10 ml Methanol extrahiert. Das Eluat wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers zur Trockene eingedampft und der verbleibende Rückstand in 100  $\mu$ l des Lösungsmittel 1 (LM1 =  $CHCl_3/0,02$  mol/l Natriumchlorid in Methanol 85:15) gelöst.

##### b. Säulenchromatographische Trennung von GFR und SFR

Hierzu wurde eine Sephadex LH-20 Chromatographiesäule hergestellt. In eine Glasbürette (äußerer Durchmesser 12 mm) wurde eine Suspension bestehend aus 2 g Sephadex LH-20 in 10-15 ml LM1 gefüllt. Unter Preßluftdruck wurde diese Säule dann unter Entfernung eventuell vorhandener Luftblasen fest gepackt.

##### 1. Glucuronidierte Konjugate

Die unter a. erhaltenen 100  $\mu$ l in LM1 gelöster Festsubstanz wurden mittels einer Pasteurpipette vorsichtig auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Der Rundkolben wurde mit insgesamt 8 ml an LM1, die vorsichtig auf die Säule geschichtet wurden, mehrere Male gespült. Unter Preßluftdruck wurde die auf der Säule befindliche Lösung behutsam in die Säule verbracht. Die Bürette wurde dann über der Säule vorsichtig mit 30 ml LM1 aufgefüllt, mit dem die GFR anschließend von der Chromatographiesäule in einen Rundkolben eluiert wurden. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und die verbleibende Festsubstanz sofort wieder gelöst (s. II.1. Glucuronidierte Konjugate).

## 2. Sulfatierte Konjugate

Zur Extraktion der noch auf der Säule befindlichen SFR wurde die Bürette über der Säule vorsichtig mit 50 µl LM2 (CHCl<sub>3</sub>/0,02 mol/l Natriumchlorid in Methanol 50:50) aufgefüllt, mit dem die SFR anschließend von der Chromatographiesäule in einen Rundkolben eluiert wurden. Diese Lösung wurde im Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und die verbleibende Festsubstanz sofort wieder gelöst (s. II.2. Sulfatierte Konjugate).

### II. Hydrolyse der Konjugate

#### 1. Glucuronidierte Konjugate

Die verbleibende Festsubstanz wurde in 10 ml 0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 6,8) gelöst und nach Zufügung von 200 µl *E.coli*-Lösung anschließend zur Hydrolyse im Wasserbad entweder bei 37°C über Nacht oder bei 50°C für zwei Stunden inkubiert.

#### 2. Sulfatierte Konjugate

Die verbleibende Festsubstanz wurde in 2 ml Methanol gelöst und es wurden 10 ml angesäuertes Ethylacetat (Ethylacetat mit konzentrierter Schwefelsäure 15 ml: 50 µl) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Säurehydrolyse der Sulfatkonjugate durch Inkubation in einem Wasserbad entweder bei 37°C über Nacht oder bei 50°C für zwei Stunden.

### III. Extraktion der hydrolysierten Proben

Falls erforderlich wurde jeder Probe 1 µg des internen Standards D<sub>3</sub>-Androstandiol (1 mg gelöst in 10 ml Methanol) zugesetzt.

#### 1. Glucuronidierte Fraktion

Die 10 ml Analyselösung wurden in einen Abscheidetrichter überführt und mit 20 ml Ethylacetat versetzt. Für mindestens 15 min. wurden die beiden Lösungen unter ständigem Rollen durchmischt. Danach wurde der Abscheidetrichter für 5-10 min. ruhig stehengelassen, um eine möglichst vollständige Trennung der beiden Phasen (organischer Ethylacetat-Extrakt und anorganischer Phosphatpuffer) zu ermöglichen. Der Ethylacetat-Extrakt, mit den aus der GFR freigesetzten Metaboliten, wurde mit 2 x 5 ml 2 mol/l Natronlauge, anschließend mit 1 x 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen; danach für mindestens 10 min. über einem

Spatel wasserfreiem Natriumsulfats getrocknet. Die wasserfreie Lösung wurde durch ein Filterpapier in einen Rundkolben dekantiert. Das Filterpapier wurde mit 5 ml Ethylacetat nachgespült. Diese Lösung wurde im Rotavapor bis zur Trockene eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 2,5 ml Methanol gelöst und in ein 3 ml Glasschraubgefäß überführt. Das Methanol wurde unter Stickstoff völlig abgedampft und der verbleibende Rückstand anschließend derivatisiert (s. 3.5.4. Derivatisierungen) nach vorangehender Reinigung, soweit erforderlich.

## 2. Sulfatierte Fraktion

Hierfür entfiel eine Extraktion mit Ethylacetat. Ansonsten wurde mit der sulfatierten Fraktion genauso verfahren wie mit der glucuronidierten Fraktion (s. III.1. Glucuronidierte Fraktion).

## IV. Aufreinigung

Die Reinigung erfolgte dünnschichtchromatographisch. Dieser Schritt unterblieb, wenn davon ausgegangen werden konnte, daß 1. die Extrakte weitgehend frei von Verunreinigungen und 2. die Menge der in den beiden Fraktionen vorhandenen Metaboliten ausreichend war, einen sicheren Nachweis in der anschließenden gaschromatographischen / massenspektrometrischen (GC/MS) Analyse zu gewährleisten. Eine Dünnschichtchromatographie-(DC)-Kammer wurde mit 100 ml eines Gemisches von Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ )/destilliertem Ethylacetat 1:1, gefüllt und mindestens 1 Stunde stehengelassen. Die zur Trockene eingeeengten Extrakte wurden in je 50  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3$  gelöst und als bis zu 4 cm langer Strich auf eine Kieselgel DC-Platte aufgetragen. Als Standard wurde  $\text{D}_3$ -Androstandiol punktförmig daneben aufgetragen. Zur Chromatographie wurde die Platte in die DC-Kammer verbracht und die Lösungsmittelfront bis etwa 2 cm unterhalb des oberen Randes der Platte laufengelassen. Nach dem Trocknen der Platte wurde die Position des mitgelaufenen Standards durch ein Sprayreagenz (10 g Molybdophosphorsäure/100 ml Ethanol) sichtbar gemacht. Die DC-Platte wurde soweit abgedeckt, daß nur die Laufstrecke des Standards freibleib und mit dem Sprayreagenz besprüht werden konnte. Durch von einem Heißluftgebläse erzeugte Wärme konnte aufgrund eines Farbumschlages (von grün-gelb nach blau-schwarz) die Lokalisation des Standards sichtbar gemacht werden, die sich etwa am Ende des ersten Drittels der Platte befand. In den Laufstrecken der Analysegemische wurde diese Distanz ebenfalls markiert und in den entsprechenden Regionen das Kieselgel abgekratzt und in 2 ml Methanol suspendiert. Je zweimal wurde die Suspension mit dem Vortex für 1 min. durchgemischt sowie anschließend für 5 min. stehengelassen. Danach wurde sie zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein 3 ml Glasschraubgefäß überführt. Das

Methanol wurde unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt und der verbleibende Rückstand anschließend derivatisiert (s. 3.5.4. Derivatisierungen).

### 3.5.1.3. Änderung in den Verfahren zur Extraktion

Bei der Extraktion von  $U_{24}$  nach intramuskulärer Applikation von  $^3\text{H}$ -DHA wurden folgende weitere Extraktionsverfahren angewendet:

#### 1. *Methanolyse der konjugierten SFR-Extrakte mit anschließender Ether-Extraktion der freigesetzten Metaboliten*

5 ml  $U_{24}$  wurden über eine SepPak- $\text{C}_{18}$ -Kartusche nach Methode A (s. 3.5.1.1. Methode A ohne I.a. Extraktion der unkonjugierten Metaboliten) extrahiert. Der SFR-Extrakt wurde nach Trocknung unter Stickstoff in 0,5 ml der Methanolyse-Lösung. (50 ml Methanol / 4 ml Acetylchlorid) gelöst und inkubiert. Der anschließend gewonnene Ether-Extrakt wurde gewaschen und getrocknet, sowie nachfolgend derivatisiert nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung). Dieses Verfahren wurde anstelle der üblicherweise angewendeten Solvolyse durchgeführt. Es sollte Aufschluß über die jeweilige Wirksamkeit der Freisetzung der sulfatierten DHA-Metaboliten im Vergleich zwischen der üblicherweise angewandten Solvolyse unter Verwendung von 'Solvolyse-Lösung' (100 ml Ethylacetat / 20 ml Methanol / 4 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure) zur Methanolyse geben.

#### 2. *Saure Hydrolyse der konjugierten Metaboliten im Urin nach Ethylacetat-Extraktion*

Aus 50 ml  $U_{24}$  wurden zunächst mit Ethylacetat die FREIEN Metaboliten (FFR) entzogen. Dieser Extrakt wurde nach Waschung und Trocknung entweder derivatisiert nach DERIVAT.1 (s. 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung) oder durch fraktionierte Chromatographie (s. 3.5.2.1. Säulenchromatographie) weiter aufgeschlüsselt (s. 4.1.2.4. Metabolisches Profil von  $^3\text{H}$ -DHA-Äquivalenten). Der  $U_{\text{NE.a.-E}}$  wurde mit 7,5 ml konzentrierter Salzsäure unter Rückfluß für eine Stunde destilliert und nach Abkühlung zweimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Der Ethylacetat-Extrakt wurde anschließend gewaschen und getrocknet (Tab. III - im Anhang). Diese 'saure Hydrolyse' wurde anstelle der Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase (zur Freisetzung der GFR) sowie der Solvolyse (zur Freisetzung der SFR) durchgeführt.

### 3. *Extraktion der Metaboliten über eine XAD<sub>2</sub>-Säule*

Verwendung eines anderen Säulenmaterials in Form einer aus Polystyren B-Körnern bestehenden Amberlite-XAD<sub>2</sub>-Säule auf die 25 ml U<sub>24</sub> appliziert und die Metaboliten mittels 2 x 75 ml Methanol eluiert wurden.

### 4. *Verwendung von gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung als Wasch-Lösung für GFR und SFR anstelle von 2 mol/l NaOH-Lösung*

Durch weniger alkalisch wirkendes NaHCO<sub>3</sub> sollte die Extraktion eventuell vorhandener, saurer Metaboliten aus den Extrakten in die Waschlösungen vermindert werden.

## 3.5.2. Chromatographien

### 3.5.2.1. Säulenchromatographie

Aus 5 g Kieselgel 60H und 27,5 ml Hexan wurde eine Suspension hergestellt. Diese wurde in eine mit einer Fritte verschlossene Glasbürette (äußerer Durchmesser 12 mm) gefüllt, wobei sich auf der Fritte eine 3 mm dicke, ebene Sandschicht befand. Unter Anwendung von Preßluftdruck wurde die Hexan / Kieselgel-Säule fest gepackt. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Oberfläche der Säule möglichst eben war. Auf die ebene Oberfläche der Säule wurde wiederum eine 3 mm dicke Sandschicht plan aufgefüllt. Die Sandschichten sollten grobe Verunreinigungen abfangen. Anschließend wurde LM1 (1,2-Dichlorethan/Ethanol 98:2) auf die obere Sandschicht bis etwa auf die doppelte Höhe der Kieselgelsäule aufgetragen. LM1 wurde mit Preßluftdruck durch die Säule laufengelassen, bis das gesamte Hexan verdrängt worden war (Farbumschlag der Säule von weiß nach fast durchsichtig) und sich auch kein LM1 mehr über der oberen Sandschicht befand. Die jeweilige Probe, welche zuvor in einer geringeren Menge an LM1 gelöst worden war, wurde vorsichtig auf die Säule aufgetragen und nachfolgend unter Preßluftdruck bis in die Kieselgelsäule vorgetrieben. Anschließend wurde die Bürette mit LM1 aufgefüllt und mit diesem unter Druck polare Metaboliten von der Säule eluiert. Mittels eines Fraktionensammlers wurden bis zu 30 Fraktionen von 3 ml Volumen gesammelt. Dann wurde das Lösungsmittel gewechselt. Eine eventuell noch verbliebene, geringe Menge an LM1 über der Säule wurde mit Lösungsmittel 2 (LM2 = 1,2-Dichlorethan/Ethanol 95:5) vermischt und unter Druck in die Säule vorgetrieben. Auf die Säule wurde dann vorsichtig LM2 geschichtet und die Bürette damit aufgefüllt. Weitere 30 Fraktionen mit einem Volumen von 3 ml wurden gesammelt. Sie enthielten stärker polare Metaboliten. Um noch vorhandene Metaboliten von der Säule zu eluieren, wurde anschließend Methanol auf die Säule aufgetragen und hiermit

wurden die noch verbliebenen, auch stärker polaren Substanzen von der Kieselgelsäule eluiert. Während des gesamten Chromatographievorganges mußte darauf geachtet werden, daß die Kieselgelsäule nicht austrocknet. Wenn radioaktive Proben chromatographiert wurden, wurden Aliquote von jeder Fraktion und dem Methanoleluat zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen. Hierzu wurden nebeneinanderliegende, Radioaktivität enthaltende Fraktionen vereinigt. Zur weiteren Analytik wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und der verbliebene Rückstand anschließend für die GC/MS-Analyse derivatisiert (s. 3.5.4. Derivatisierungen).

### 3.5.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

20 µl - 100 µl Lösungen verschiedener, radioaktiv markierter Extrakte wurden mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt und chromatographisch aufgetrennt (NEDDERMAN, 1992). Bei dem dazu verwendeten Gerät handelte es sich um ein isokratisches System bestehend aus einer 2150 HPLC Pumpe der Firma LKB Bromma, einem Chrom-A-Scope UV-Detector mit variabler Wellenlänge der Firma bdr spec und einem automatischen Fraktionensammler Fraction Collector Frac 100, Pharmacia, der Firma Pharmacia LKB Biotechnology, Milton Keynes, Beds, U.K. Zur Chromatographie wurde eine Econosil C<sub>18</sub>-Alltech-Chromatographiesäule, Länge 250 mm, i. D., Teilchengröße 10 µm, der Firma Alltech Associates Applied Science Ltd., Cornforth, Lancs., U.K., verwendet. Die Proben wurden einzeln, manuell injiziert. Es erfolgte eine 'reversed-phase' Chromatographie. Folgende Lösungsmittelkombinationen fanden als Fließmittel Anwendung:

1. 0,1 mol/l Acetylsäure                      zu 60%
2. Acetonitril                                      zu 40%

Die Durchflußrate betrug 5 ml/min. Als Standard wurde Testosteron in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm. Unter den gegebenen Bedingungen betrug die Retentionszeit für Testosteron 20 min. Da bei einer 'reversed-phase' Chromatographie Substanzen mit höherer Polarität zuerst eluiert werden (HOLME und PECK, 1985), kann davon ausgegangen werden, daß die in den Extrakten enthaltenen Steroid-Metaboliten, die eine höhere Polarität als Testosteron besitzen (HOLME und PECK, 1985), vor diesem von der Chromatographiesäule eluiert werden, auch wenn sie im UV-Bereich nicht nachgewiesen werden konnten. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1,25 ml gesammelt. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 250 µl aus jedem Gefäß in 6 ml Mini-Scintillationsgefäße überführt und mit jeweils 3 ml Instagel vermischt. Für den Leerwert wurden 250 µl des Fließmittels mit Scintillationsflüssigkeit versetzt. Diese Proben wurden dann zur Feststellung ihrer β-Strahlungsaktivität in einen Flüssigscintillationszähler verbracht.

### 3.5.3. Lyophilisierung

Die zu lyophilisierenden Volumina an Urin und Plasma wurden in 25 ml Rundkolben verbracht und in einem Gefrierschrank bei  $-85^{\circ}\text{C}$  für etwa eine halbe Stunde vorgekühlt. Währenddessen wurden der Lyophilisator und die zur Befestigung der Rundkolben benötigten Aufbauten ebenfalls vorgekühlt. Zum vollständigen Ausfrieren des Wassers wurden die Rundkolben in einem Methanolbad bei  $-15^{\circ}\text{C}$  solange rotiert, bis ein Film aus gefrorenem Urin oder Plasma an der Innenwand des Rundkolbens entstand. Anschließend wurden die Rundkolben am Lyophilisator (Modylo-Lyophilisator der Firma Edwards High Vacuum, Crawley, U.K.) befestigt und ein Vakuum von  $-76$  Torr erzeugt. Dieses wirkte bei  $-45^{\circ}\text{C}$  etwa 24 Stunden auf die gefrorenen Lösungen. Nach vollendeter Gefriertrocknung wurden die Rundkolben vom Lyophilisator abgenommen und die lyophilisierten Substanzen in 5 ml entionisiertem Wasser wieder gelöst (GINN, 1992; JONES, 1992).

### 3.5.4. Derivatisierungen

#### 3.5.4.1. MO-TMS-Derivatisierung (DERIVAT.1) - (im HFL entwickelte Methode)

Die zur Trockene eingedampften Extrakte (s. 3.5.1. Extraktionsmethoden) wurden in einer Lösung aus 50  $\mu\text{l}$  Methoxyamin-Hydrochlorid in wasserfreiem Pyridin (5%ige Lösung) durch Rütteln am Vortex gelöst. Diese Lösung wurde entweder für 30 min. bei  $60^{\circ}\text{C}$  erhitzt oder über Nacht bei Raumtemperatur stengelassen. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter Stickstoff bei  $40-60^{\circ}\text{C}$  völlig abgedampft. Dem verbleibenden Rückstand wurden 50  $\mu\text{l}$  N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA) sowie 1  $\mu\text{l}$  N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-trifluoroimidazol (MSTFI) als Katalysator hinzugefügt, mit dem Vortex gründlich durchmischt und dann wie oben verfahren. Überschüssiges Reagenz wurde unter Stickstoff bei  $40-60^{\circ}\text{C}$  völlig abgedampft; die verbleibende Restsubstanz in etwa 100 ml einer  $\text{CHCl}_3$ /Hexan-Lösung (1:1) wieder gelöst und auf eine selbst hergestellte Mini-Säule aufgetragen. Das Glasschraubgefäß wurde mit  $\text{CHCl}_3$ /Hexan-Lösung einige Male gespült und auch die Spülflüssigkeit auf die Säule übertragen. Die Säule bestand aus Sephadex LH-20, suspendiert in einer  $\text{CHCl}_3$ /Hexan 1:1 - Lösung verbracht in eine Pasteurpipette, die oberhalb der Spitze mit Baumwolle verschlossen war. Die Höhe des Trägermaterials betrug 2 cm. Die derivatisierten Steroide und Metaboliten wurden mit derselben Lösung von der Säule eluiert. Es wurden insgesamt 2 ml in einem 3 ml Glasschraubgefäß gesammelt. Diese wurden unter Stickstoff zur Trockene eingedampft und der verbliebene Rückstand in 25  $\mu\text{l}$  Undekan am Vortex gelöst. Die so erhaltene Lösung ist praktisch unbegrenzt haltbar (TEALE und HOUGHTON, 1991). 1-2  $\mu\text{l}$  Aliquote dieser Lösungen wurden dann zur GC/MS-Analyse verwendet.

### **3.5.4.2. Oxim-TBDMS-Derivatisierung (DERIVAT.2) - (im HFL entwickelte Methode)**

Die zur Trockene eingedampften Extrakte (s. 3.5.1. Extraktionsmethoden) wurden in einer Lösung von 50 µl Hydroxylamin Hydrochlorid in wasserfreiem Pyridin (8%ige Lösung) unter Rütteln am Vortex gelöst und für 30 min. bei 80 °C erhitzt oder über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde überschüssiges Lösungsmittel unter Stickstoff völlig abgedampft. Zu dem verbleibenden Rückstand wurden 50 µl Diethylamin-Hydrochlorid (als 5%ige Lösung in Dimethylformamid) sowie 50 µl N-Methyl-N-(t-Butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MTBSTFA) hinzugefügt, am Vortex gut durchmischt und für 60 min. bei 80°C erhitzt oder über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden dieser Lösung 0,5 ml entionisiertes Wasser sowie 2 ml Diethylether zugefügt und mit dem Vortex sorgfältig durchmischt. Nach Phasentrennung wurde mit einer Pasteurpipette die Etherphase abgehebert, in ein neues 3 ml Glasschraubgefäß überführt und der Ether unter Stickstoff völlig abgedampft. Der verbliebene Rückstand wurde in 50 µl Undekan unter Rütteln am Vortex gelöst. Die so hergestellte Lösung ist praktisch unbegrenzt haltbar (TEALE und HOUGHTON, 1991). 1-2 µl Aliquote dieser Lösung wurden zur GC/MS-Analyse verwendet.

### **3.5.5. Probenbereitung für die Scintillationszählung**

#### **3.5.5.1. Plasma- und Urinproben**

Nach der Zentrifugation (s. 3.3.2. Nach der Applikation) wurden von jeder Plasma- und Urinprobe, auch von den Leerwerten, zwei Aliquote von 1 ml (Plasma) oder 200 µl (Urin) entnommen und in 20 ml (Plasma) bzw. 6 ml (Urin) Plastikscintillationsgefäße überführt. Jeder Probe wurden 10 ml (Plasma) bzw. 3 ml (Urin) Instagel zugefügt, die Schraubgefäße verschlossen und mit dem Vortex gut durchgemischt. Die von jeder Plasmaprobe emittierte  $\beta$ -Strahlung wurde, nach einer Vorkühlzeit von einer Stunde, während 20 min. (Plasma) bzw. 10 min. (Urin) in einem Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen. Von den Doppelproben wurde das arithmetische Mittel, angegeben in DPM (Desintegrations per Minute = radioaktive Zerfälle pro Minute), als Wert für die enthaltene Radioaktivität errechnet (BIRKS, o.J.; AMERSHAM INTERNATIONAL, 1983; HORNER, 1991; SEYMOUR, 1992a+b).

#### **3.5.5.2. Extrakte**

Während der Urinextraktion wurden von den anfallenden Urin-, Extraktions- und Waschlösungen (z.B.:  $U_{V/E}$ , GFR) je 2 x 100 µl oder 200 µl-Stichproben entnommen. Diese wurden entsprechend dem Vorgehen bei den Urinproben weiterbehandelt.



### 3.5.5.3. Proben von Dünnschichtchromatographie-Platten

Die Überprüfung der Reinheit der verwendeten, radioaktiv markierten Substanzen und Reaktionsgemische, erfolgte durch Radiochromatographie auf Dünnschichtplatten (s. 4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse). Hierzu wurden die verwendeten DC-Platten für die Scintillationszählung wie folgt aufgearbeitet:

Die Chromatographie und Markierung erfolgte nach dem unter 3.5.1.2.IV *Aufreinigung* beschriebenen Verfahren mit folgenden Modifikationen:

Eine 20 x 20 cm Aluminium-DC-Platte wurde durch Auskratzen von 3 mm breiten Trennlinien in Kanäle von 1 cm Breite unterteilt. Auf der 3 cm vom unteren Rand der DC-Platte entfernten 'Startlinie' wurden in der Mitte eines jeden Kanals mit einer 5 µl Glas-Micro-Kapillare die zu chromatographierenden Lösungen punktförmig unter einem leichten Strom von Stickstoff aufgetragen. Die für die Scintillationszählung aufzuarbeitenden Kanäle wurden in ihrer gesamten Länge mit einem Tesafilmstreifen abgedeckt und durch Markierungen in 1 cm hohe Abschnitte unterteilt. Im Bereich der Substanzmarkierungen richtete sich die Höhe der Abschnitte nach den Ausmaßen der jeweiligen Markierung, so daß hier auch größere oder kleinere Abschnitte entstehen konnten. Zusätzlich wurde ein 1 cm hoher Abschnitt unterhalb der Startlinie markiert. Als Leerwert diente ein 1 x 1 cm großes Stück der DC-Platte in möglichst weiter Entfernung von der Laufstrecke der radioaktiven Probe. Von der markierten Platte wurde eine Photokopie angefertigt und die Entfernungen der einzelnen Abschnitte von der Startlinie wurden festgehalten. Anschließend wurde die Platte in die einzelnen markierten Abschnitte zerschnitten. Jeder Einzelabschnitt wurde in ein mit 1 ml Methanol gefülltes, 20 ml Plastikscintillationsgefäß überführt und mit Hilfe von zwei Pinzetten die DC-Platte und der Tesafilmstreifen innerhalb des Gefäßes voneinander getrennt. Nach Verschließen wurden die Gefäße vorsichtig geschüttelt und für einige Minuten stehengelassen. Anschließend wurden alle Gefäße mit 10 ml Instagel aufgefüllt und der Inhalt gut durchmischt. Nach einer Vorkühlzeit von mindestens einer Stunde im Flüssigkeitsscintillationszähler wurde die Radioaktivität der einzelnen Proben während einer Zählphase von 10 min. als DPM ermittelt. Eventuell durch Lumineszenz verursachte, in dem Leerwert festgestellte Strahlung wurde zur Korrektur von den für die übrigen Abschnitte ermittelten Strahlungswerten abgezogen.

### 3.5.6. Versuchsauswertung

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte nach BAGGOT (1977a+b). Teilweise wurde dazu auch das Computerprogramm PCS Version 4.0 (PCS = Pharmacological Calculation System) nach TALLARIDA und MURRAY (1987) verwendet. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte entsprechend dem von RIEGELMANN et al. (1968)

eingeführten, offenen Zwei-Kompartiment-Modell mit folgenden Beziehungen:

1. Resorptionskonstante =  $k_a$ :

$$k_a = \ln \Delta C_1 - \ln \Delta C_2 / t_2 - t_1 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

wobei  $\Delta C_1$  und  $\Delta C_2$  die berechnete Plasmakonzentration zu den Zeiten  $t_1$  und  $t_2$  darstellen.

2. Eliminationskonstante =  $k_{el}$ :

$$k_{el} = \ln C_1 - \ln C_2 / t_2 - t_1 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

3. Biologische Halbwertszeit =  $t_{1/2}$ :

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{el} \text{ (h)}$$

4. Maximale Konzentration, d.h. höchste erreichte Arzneimittelkonzentration im Plasma =  $C_{max}$   
(DPM / ml)

5. Zeitpunkt, an dem  $C_{max}$  auftritt =  $t_{max}$  (h)

### 3.6. Flüssigscintillationszähler

Zwei Flüssigscintillationszähler standen für die Untersuchungen zur Verfügung:

1. Kontron Analytical 'BETAmatic II Liquid Scintillation Counter' verbunden mit einem Kontron Mikrocomputer 'PSI.80D'-Computer. Die Quenchkorrektur erfolgte für das jeweilige Radioisotop ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) durch Erstellung einer Quenchkurve mit  $\text{CCl}_4$  stellvertretend für die zu analysierenden Flüssigkeiten über das Kanalverhältnis - 'Sample Channels Ratio Method (SCR-Method)'.

2. Kontron Analytical 'Betamatic IV/V Liquid Scintillation Counter' mit integriertem Datensystem. Die Quenchkorrektur erfolgte auch hier wie für 1. Kontron Analytical 'BETAmatic II Liquid Scintillation Counter' beschrieben.

### 3.7. Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die GC/MS-Analyse der verschiedenen Proben wurde an unterschiedlichen Gaschromatographen und Massenspektrometern unter folgenden Bedingungen durchgeführt (ROSE, 1990):

1. Hewlett Packard 5890 Gaschromatograph in Verbindung mit einem Hewlett Packard Selektiven Massendetektor und angeschlossenem Datensystem (Data Master II).

*Chromatographie-Säule:* 30m SE30 mit 0,25 mm i.D. und 0,2 mm Filmdicke

*Trägergas:* Helium    *Flußrate:* 40 cm/s    *Säule:* Kieselgel

*Temperatur:*

Injektor: 260°C

Transfersäule: 280°C

*Temperaturprogramm:*

Anfangstemperatur: 150°C für 1 min.

Erhöhung: 20°C/min. bis 240°C

5°C/min. bis 310°C

*Isothermie:* 310°C für 4 min.

*Detektion:* MID in entsprechenden 'Zeitfenstern' - 10-15 min. & 15-20 min.

EI; Elektronenenergie: 70 eV

2. Finnigan MAT TSQ 70, bestehend aus mehreren Einlaßsystemen (über einen Gaschromatographen oder direkt), einem dreifachen Quadrupol-Massenspektrometer und einem Datensystem. Das verwendete Gerät war ausgestattet mit einer Elektronen-Ionisation (EI)/Chemische Ionisation (CI)/Schnell Atom Beschuß (FAB) - Ionen-Quelle.

*Chromatographie-Säule:* SGE/BPX5 SPE-Phase 25 m; 0,32 mm i.D. und 0,2 µm Filmdicke

*Trägergas:* Helium    *Flußrate:* 40 cm/s    *Säule:* Kieselgel

*Temperatur:*

Injektor: 280°C

Transfersäule: 280°C

Verschuß des Trennventils für 1 min.

*Temperaturprogramm:*

Anfangstemperatur: 150°C für 1 min.

Erhöhung: 20°C/min. bis 220°C

5°C/min. bis 300°C

*Isothermie:* 300°C für 1 min.

*Detektion:* Massen von 100 amu bis 450 amu oder 650 amu  
von 8 min. bis 18 min.

EI und/oder CI, Elektronenenergie: 70 eV,

3. Hewlett Packard 5890A Gaschromatograph gekoppelt mit einem Finnigan Ion Trap Detector™, einschließlich Datensystem.

*Chromatographie-Säule:* 30 m SE30; 0,25 mm i.D. und 25 µm Filmdicke

*Trägergas:* Helium    *Flußrate:* 40cm/s    *Säule:* Kieselgel

*Temperatur:*

Injektor: 240°C

Transfersäule: 260°C

*Temperaturprogramm:*

Anfangstemperatur: 150°C für 1 min.

Erhöhung: 20°C/min. bis 220°C

5°C/min. bis 320°C

*Isothermie:* 320°C für 1 sec.

*Detektion:* Massen von 100 amu bis 450 amu oder 600 amu  
von 1 min. bis 20 min.

EI, Elektronenenergie: 70 eV

4. Fisons Instruments Gaschromatograph der 8000er Serie gekoppelt mit einem Fisons Instruments Massendetektor 800 einschließlich Datensystem

*Chromatographie-Säule:* 30m SE30; 0,25 mm i.D. und 0,25 µm Filmdicke

*Trägergas:* Helium    *Flußrate:* 40 cm /s    *Säule:* Kieselgel

*Temperatur:*

Injektor: 250°C

Transfersäule: 220°C

*Temperaturprogramm:*

Anfangstemperatur: 150°C für 1 min.

Erhöhung: 20°C/min. bis 250°C

5°C/min. bis 310°C

*Isothermie:* 310°C für 4 min.

*Detektion:* Massen von 50 amu bis 650 amu von 8 min. bis 18 min.

EI und/oder CI, Elektronenenergie: 70 eV